

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA PAULA MARTIN CARDOZO

**USO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) COM AZUL DE
METILENO EM ESTUDOS DE MODELOS ANIMAIS: REVISÃO SISTEMÁTICA**

SÃO PAULO 2021

ANA PAULA MARTIN CARDOZO

USO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT) COM AZUL DE METILENO EM ESTUDOS DE MODELOS ANIMAIS: REVISÃO SISTEMÁTICA

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, como requisito para obtenção de título de mestre em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rebeca Boltes Cecatto

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela de Fátima Teixeira da Silva

SÃO PAULO 2021

Cardozo, Ana Paula Martin.

Uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com azul de metileno em estudos de modelos animais: revisão sistemática. / Ana Paula Martin Cardozo. 2021.

76 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Daniela de Fátima Teixeira da Silva.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Rebeca Boltes Cecatto.

1. Animais de experimentação. 2. Agentes antimicrobianos.

Terapia fotodinâmica. 3. Azul de metileno. 4. Infecções.

I. Silva, Daniela de Fátima Teixeira da. II. Cecatto, Rebeca Boltes. III. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 29 de junho de 2021 .

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Ana Paula Martin Cardozo

Título da Dissertação: "Uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) com azul de metileno em estudos de modelos animais: revisão sistemática".



Presidente: PROF. DR. REBECA BOLTOS CECATTO



Membro: PROF. DR. LARA JANSISKI MOTTA



Membro: PROF. DR. CHRISTINA MAY MORAN DE BRITO

DEDICATÓRIA

Ao meu marido,

Marcos Roberto, companheiro de caminhada nesta trajetória, pela sua compreensão e apoio às minhas escolhas. Aos meus filhos Camila, Mariana, Henrique e Carolina, sou honrada por me escolherem para compartilharmos nossos aprendizados nesta existência. Minha eterna gratidão pela paciência nas minhas ausências, entendimento no que acredito e amor incondicional.

“Junte sua mão a minha, que eu junto meu coração ao seu, para que juntos possamos fazer o que sozinhos não conseguimos.” (Mantra)

DEDICATÓRIA ESPECIAL

À Prof.^a Dr.^a Daniela de Fátima Teixeira da Silva pelo incentivo à incessante busca pelo aprendizado, que é infinito, assim como sua dedicação, sempre me encorajando em todos os momentos. Dedico toda minha gratidão, admiração e meu profundo sentimento de amizade e bem querer.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lucia Helena e Eduardo, por me ensinarem que do estudo, vem o crescimento no trabalho. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, e acreditarem nos meus sonhos.

Às minhas irmãs, Fabiana e Lívia, pela parceria, compreensão, reciprocidade e amor que nos mantém unidas a vida toda.

À Universidade Nove de Julho – UNINOVE, minha mais nova casa, que me acolheu, recebeu de portas abertas e permitiu desenvolver meu aprendizado na ciência.

À Prof.^a Dr.^a Kristianne Porta Santos Fernandez e toda equipe de professores do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, que não medem esforços em nos guiar nos caminhos do conhecimento e ensino.

À minha orientadora Rebeca Boltes Cecatto pela sua docilidade, paciência, compreensão e confiança em mim depositada.

Aos amigos pelo estímulo para finalização do meu projeto.

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma terapia não invasiva utilizada para tratamento de doenças infecciosas, que permite a eliminação de fungos e bactérias. Se por um lado a PDT é cada vez mais estudada, por outro ainda há dúvida sobre o nível de evidência dos resultados publicados. Dessa forma, o objetivo do estudo é realizar uma revisão sistemática sobre o uso da aPDT com azul de metileno (AM) em modelos animais cujo desfecho tenha sido a quantificação microbiológica. Foram revisados artigos científicos publicados nas bases eletrônicas MEDLINE, Embase, Opengray e LILACS via Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), no período de 1995 a 2020, nas línguas inglesa, portuguesa, francesa, italiana ou espanhola. Após a busca inicial, 1842 estudos relacionados ao tema foram encontrados e, destes, 21 foram incluídos para extração de dados, somando um total de 550 animais estudados, sendo todos estudos controlados, 07 randomizados e 03 com cegamento. Cerca de 12 estudos avaliaram infecções de pele, sendo 03 por *Leishmania amazonensis*, 07 infecções bacterianas e 02 estudos por fungo; 02 estudos avaliaram candidíase vaginal; 02 estudos avaliaram artrite piogênica; 01 estudo avaliou tricomoníase vaginal; 01 estudo avaliou onicomicose; 01 estudo avaliou cistite bacteriana; 01 estudo avaliou ceratite por fungo e 01 estudo avaliou rinosinusite bacteriana. **Discussão e conclusões:** Os dados mais promissores se referem à onicomicose, candidíase vaginal e nas infecções de pele bacterianas e por *Leishmania Tegumentar*. Não foram relatados efeitos adversos animais da aPDT nos estudos incluídos na revisão atual, sugerindo que aPDT é uma técnica segura quando aplicada de forma controlada, sob supervisão, e nas infecções superficiais. Em relação aos parâmetros da aPDT os estudos de melhor qualidade encontraram lasers, diodo emissor de luz (DEL) e lâmpadas utilizadas, sempre englobando o comprimento de onda vermelho, compatível com o AM; as irradiâncias variaram de 3.3 a 50 W/cm²; as exposições radiantes variaram 6 a 360 J / cm², e os tempos de irradiação variaram de 85,6 segundos a 60 minutos. A enorme variabilidade dos protocolos utilizados não nos permitiu realizar uma análise quantitativa / metanálise.

Palavras-chave: Animais de experimentação, Agentes antimicrobianos, Terapia Fotodinâmica, Azul de Metileno, Infecções.

ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a minimally invasive alternative therapy used to treat infectious diseases, which allows the elimination of fungi and bacteria. If, on the one hand, aPDT is increasingly studied, on the other there is still doubt about the level of evidence of the published results, either due to the difficulty in analysing the different values of each parameter or the parameters themselves. Thus, the objective of this study is to carry out a systematic review on the use of aPDT with methylene blue (MB) in animal models whose outcomes have been microbiological quantification. Studies published in the electronic databases of MEDLINE, Embase, OpenGrey and LILACS were reviewed from 1995 to 2020, in English, Portuguese, French, Italian and Spanish. After the initial search, 1842 studies related to the topic were found and of these, 21 were included for data extraction, adding up to a total of 550 animals studied, all being controlled studies, 07 randomized and 03 blinded. About 12 studies evaluated skin infections, 03 by *Leishmania amazonensis*, 07 by bacterial infections and 02 by fungus; 02 studies evaluated vaginal candidiasis; 02 studies evaluated pyogenic arthritis; 01 study evaluated onychomycosis; 01 study trichomoniasis vaginal; 01 study evaluated bacterial cystitis; 01 study evaluated fungal keratitis and 01 study evaluated bacterial rhinosinusitis. **Discussion and conclusions:** The most promising data refer to onychomycosis, vaginal candidiasis, and bacterial or *Leishmania Tegumentar's*. skin infections. No animal adverse effects of aPDT were reported suggesting that aPDT is a safe technique when applied in a controlled manner, under supervision, and in superficial infections. Regarding MB and light parameters, the better quality studies show lasers, light emitting diode (LED) and lamps used, always encompassing the red wavelength, being compatible with MB; irradiances ranged from 3.3 to 50 W/cm²; radiant exposures ranged from 6 to 360 J / cm², and irradiation times ranged from 85,6 s to 60 min. The enormous variability of the protocols used did not allow us to perform a quantitative analysis / meta-analysis.

Keywords: Animal Experimentation, Anti-Bacterial Agents, Photodynamic Therapy, Infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama de Jablonski	17
Figura 2: Reações de Fenton-Weiss	19
Figura 3: Reação química de formação do radical hidroxila a partir do ânion superóxido e ácido nítrico	19
Figura 4: Estrutura molecular do azul de metileno	20
Figura 5: <i>Fluxograma Prisma</i>	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: microorganismos – <i>Leishmania amazonensis</i>	29
Tabela 2: microorganismos – bactérias em infecções de cavidades profundas	34
Tabela 3: microorganismos – bactérias em infecções superficiais	40
Tabela 4 : microorganismos – fungos em infecções de cavidades profundas	46
Tabela 5: microorganismos – infecções fúngicas	51
Tabela 6: parâmetros dosimétricos	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AM - azul de metileno

aPDT - terapia fotodinâmica antimicrobiana

BVS- biblioteca virtual de saúde

CEP - comitê de ética e pesquisa

DAP- doença arterial periférica

DEL-diodo emissor de luz

FS - fotossensibilizante

LED– light emitting diode

MA – metanálise

MB – methylene blue

NAM - novo azul de metileno

nm - nanometro

PDT - terapia fotodinâmica (do inglês: photodynamic therapy)

PDT-AM - terapia fotodinâmica com azul de metileno

RB - Rose bengal

ROS - espécie reativa de oxigênio (do inglês: reactive oxygen species)

RS - revisão sistemática

RR- risco relativo

SOD - enzima superóxido dismutase

LISTA DE SIGLAS

S_0 – estado fundamental

S_1 – estado singlete

T_1 - estado triplete

O^- - ânion radical superóxido

O_2^{\cdot} - radical hidroxila

ROO^{\cdot} - radical peroxila

RO^{\cdot} - radical alcoxila

O_2 – oxigênio

O^- - ânion radical

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

$HClO$ – ácido hipocloroso

1O_2 – oxigênio singlete

H_2O – água

$ONOO^-$ - peroxinitrito

$HOONO$ – ácido peroxinitroso

NO^3 – nitrito

SUMÁRIO

Introdução.....	13
Justificativa.....	15
Contextualização.....	16
Objetivo geral.....	23
Objetivos específicos.....	23
Metodologia.....	24
Estratégias de busca.....	24
Critérios de Elegibilidade.....	25
Critérios de inclusão.....	25
Critérios de exclusão.....	25
Resultados.....	26
Análise de viés.....	26
Extração de dados.....	26
Análise estatística.....	27
Resultados.....	28
Discussão.....	55
Limitações.....	67
Conclusão.....	68
Referências bibliográficas.....	69

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT - photodynamic therapy) é uma modalidade clínica, usada para tratar algumas doenças infecciosas, causadas por fungos, vírus ou bactérias. O efeito da PDT depende da ativação de um agente fotossensibilizante (FS), que pode ser tópico ou sistêmico, pela exposição a uma luz visível, em um comprimento de onda adequado à absorção ao agente fotossensibilizante, que promoverá a morte das células-alvo, através de reações fotoquímicas pela formação de espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio são responsáveis pelos danos às biomoléculas e consequente morte das células alvo indesejadas (BACELLAR, 2015).

O azul de metileno é um corante amplamente utilizado na terapia antimicrobiana, diluído em solução aquosa, em várias concentrações. É um fotossensibilizante da classe das fenotiazinas, que apresenta excelentes propriedades fotoquímicas, com intensa absorção da luz em torno de 630 – 660 nanômetros (nm) e promove agregação no tecido-alvo, dependendo da concentração utilizada e do meio em que se encontra. Embora existam outras classes de moléculas que atuam como agentes fotossensibilizantes na PDT, o azul de metileno apresenta vantagens na sua utilização, tais como: ser citotóxico na presença da luz e em comprimento de onda adequado e não ser tóxico no escuro, não provoca efeitos carcinogênicos ou mutagênicos, apresenta alta seletividade pelos tumores ou microrganismos e não por células normais, uso por via não invasiva, estável, economicamente viável, atua com maior absorção nos tecidos moles na luz visível, apresenta estrutura bem definida e pureza química (BENOV, 2015).

A revisão sistemática em modelos animais auxiliará a esclarecer se aPDT é útil para tratar feridas infectadas, sendo que as infecções são complicações bastante comuns nos processos de cicatrização das feridas. As terapias clássicas para tratamento de feridas infectadas são caras e frequentemente ineficazes. Os antibióticos têm perdido sua efetividade, devido ao abuso no uso dos mesmos, permitindo aumento do número de

bactérias multirresistentes. Portanto, há uma grande necessidade de terapias alternativas para o tratamento de feridas infectadas.

A pesquisa pré-clínica pode ser usada para descrever quais procedimentos podem ser testados nas pesquisas clínicas, descrever o alcance das intervenções e quais das condições testadas tem maior eficácia. Será possível avaliar também possíveis vieses na avaliação dos resultados e quais medidas poderão ser tomadas para diminuir os mesmos. E, se os dados obtidos na revisão sistemática permitirem, realizar a metanálise, para que se obtenha uma estimativa da direção e da magnitude do efeito da intervenção agrupada (de VRIES, 2015).

1.1 Justificativa

A principal motivação para esta revisão sistemática é avaliar os resultados dos diferentes protocolos utilizados na aPDT com azul de metileno, nos tratamentos de doenças infecciosas em estudos de modelos animais. Se por um lado a aPDT é cada vez mais estudada, por outro ainda há dúvida sobre o nível de evidência dos resultados publicados, seja pela dificuldade em analisar os valores distintos de cada parâmetro, ou os próprios parâmetros entre si.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

Desde as civilizações antigas, é conhecido o efeito da luz sobre os tecidos biológicos. Os egípcios, gregos e astecas conheciam os benefícios da luz solar, quando exposta sobre o corpo humano. Muitos estudos foram realizados para se conhecer a interação dos efeitos da luz nos alvos biológicos e estabelecer o conceito de fotobiomodulação, o qual pode significar bioestimular ou bioinibir, dependendo dos parâmetros dosimétricos da radiação utilizada e dos tecidos-alvo atingidos por esta radiação (KARU, 2014). O efeito da interação dos fótons com as células é uma condição essencial necessária para ocorrer fotobiomodulação. A integração de parte da luz incidente depende do comprimento de onda, da irradiância - que é o parâmetro que avalia a possibilidade de ocorrer efeito térmico no tecido, do tempo de interação luz/tecido e o tipo de tecido exposto à luz (LANZAFAME, 2011).

A terapia fotodinâmica (PDT), do inglês Photodynamic Therapy, é uma modalidade de tratamento clínico usada para tratar doenças infecciosas e câncer, com potencial aplicação na eliminação de micro-organismos tais como vírus, fungos e bactérias, mesmo aqueles resistentes a antimicrobianos usados nas terapias tradicionais. O principal agente é um fotossensibilizante (FS), que pode ser administrado topicamente ou sistemicamente, sendo distribuído nos tecidos e apresenta acúmulo preferencial nas células-alvo, sem atingir os tecidos saudáveis. O FS, quando excitado pela luz no comprimento de onda adequado, produz espécies reativas de oxigênio, que são responsáveis por promover o dano biomolecular e levar a morte celular, que é o resultado desejado da PDT (BACELLAR, 2015).

No mecanismo de ação da PDT estão envolvidos fenômenos fotofísicos na ação fotodinâmica, nos quais o agente fotossensibilizante em um comprimento de onda adequado, absorve uma luz visível, passando do estado singlete fundamental (S_0) para o estado singlete excitado (S_1). Neste estado singlete, que apresenta curto período de vida, o FS pode perder energia por processos radiativos (fluorescência), não-radiativos ou formar o estado triplete (T_1) por cruzamento intersistemas. No estado triplete, que apresenta período de vida mais longo que o estado singlete, o FS pode perder energia por processos radiativos (fosforescência), não radiativos, ou pode participar da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive

Oxygen Species) por dois mecanismos distintos: transferência de elétrons, formando radicais livres - Reação do Tipo I; ou por transferência de energia ao oxigênio molecular, formando oxigênio singlete - Reação do Tipo II (De ROSA, MC; CRUTCHLEY, RJ, 2002).

O Diagrama de Jablonski descreve os mecanismos fotofísicos do mecanismo da PDT, conforme a figura 1:

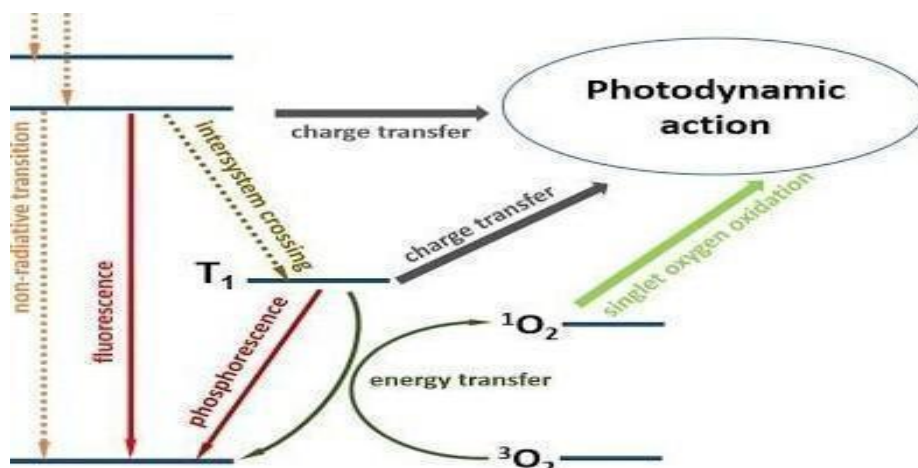


Figura 1 - Diagrama de Jablonski.

Fonte: CePOF & INCT Óptica Básica Aplicada

A oxidação é parte natural da vida aeróbia e do nosso metabolismo, onde os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O estresse oxidativo é a condição, em que ocorre um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a ação de substâncias antioxidantes, a favor dos radicais livres oxidantes, que promove a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e alterações na homeostase do organismo. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se nos átomos de oxigênio, é chamado espécie reativa de oxigênio (BARREIROS, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem diversos compostos, radicalares ou não-radicalares, que participam das reações de oxidação responsáveis pelo efeito da PDT. Dentre os compostos radicalares temos: ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}).

Dentre os compostos não-radicalares temos: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ácido hipocloroso ($HClO$) (de ROSA; CRUTCHLEY, 2002).

O oxigênio singlete (1O_2) se apresenta no estado excitado, não radicalar, é a forma mais deletéria do oxigênio ao organismo, pois provoca toxicidade fotoinduzida do O_2 ao organismo vivo. O seu tempo de meia-vida depende do meio em que se encontra. Em meio aquoso, a meia-vida é curta, pois o 1O_2 se choca com as moléculas de água (H_2O) e transfere sua energia. Em meio orgânico, a meia-vida do 1O_2 é maior, podendo causar reações químicas com algumas classes de biomoléculas (BARREIROS, 2006).

O 1O_2 apresenta uma característica única, pois é a única ROS que é um estado excitado eletronicamente. Geralmente, é produzido quando um FS, exógeno ou endógeno, que absorve uma radiação visível, em comprimento de onda adequado, na presença de O_2 (REDMOND; KOCHEVAR, 2006).

As reações de interconversão das ROS podem gerar espécies reativas secundárias a partir da associação com outros átomos ou moléculas, tais como:

- a) a enzima superóxido dismutase (SOD) destrói o ânion radical superóxido gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é pouco reativo, mas pode difundir-se na célula participando de outras reações (REDMOND; KOCHEVAR, 2006);
- b) as Reações de Fenton e Haber-Weiss, respectivamente, são reações mediadas por ferro, que geram radicais hidroxila e são mais reativas com biomoléculas, do que o peróxido de hidrogênio e o ânion radical superóxido. A Reação de Fenton é a segunda etapa da Reação de Haber-Weiss (Figura 2) (PATEL; RAMAVATARAM, 2012);

Seqüência da reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss

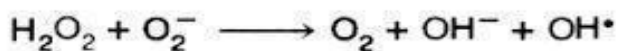


Figura 2: Reações de Fenton e Haber-Weiss.

Fonte: radicaisbiobio.blogspot.com

c) a Reação entre o ânion radical superóxido e óxido nítrico resulta na formação de peroxinitrito (ONOO^-), o qual em pH neutro é protonado rapidamente formando o ácido peroxinitroso (HOONO), que é instável e se decompõe em dióxido de nitrogênio, radicais hidroxila e íons nitrato (NO_3^-) (Figura 3) (TOMANEK,2015).



Esquema 3. Formação do HONO_2 e sua decomposição

Figura 3: formação do radical hidroxila, a partir da reação do ânion superóxido e óxido nítrico

Fonte: BARRETO, 2005

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma efetiva modalidade alternativa para tratamento de infecções localizadas, através da aplicação de um FS, seguido da irradiação, com adequado comprimento de onda, do local contaminado. O mecanismo

específico de ação da aPDT não está associado ao desenvolvimento de resistência (JORI, 2006).

A aPDT apresenta diversas vantagens em relação a outros tratamentos: a fotoativação permite uma ação localizada reduzindo efeitos colaterais da PDT, sendo que o FS é inofensivo na ausência de luz. A aPDT também pode ser realizada em conjunto com outros procedimentos clínicos. É também possível de ser utilizada em serviços públicos de saúde, pois a combinação da luz com o FS tem baixo custo.

É não invasiva, e pode ser usada em múltiplas células-alvo e não desenvolver resistência ao FS (BENOV, 2015; HAMBLIN, 2004).

Atualmente, existem várias classes de moléculas usadas como fotossensibilizantes para PDT, tais como: porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e as fenotiazinas. O azul de metileno (AM) é um FS pertencente à classe das fenotiazinas, que são corantes heterocíclicos formados por dois anéis de benzeno ligados por um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre (Figura 4) (BACELLAR, 2014).

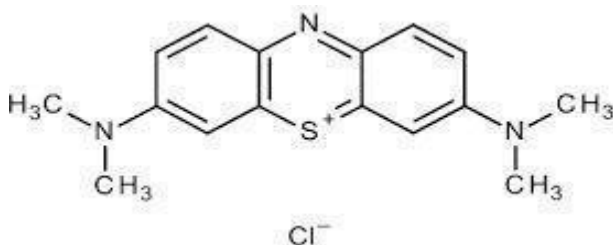


Figura 4: estrutura molecular do azul de metileno

Fonte: www.clubedaquimica.com

O potencial antimicrobiano do AM é bem reconhecido e aplicado em vários campos antimicrobianos. O alcance da ação do azul de metileno é devido à combinação da estrutura química simples e a facilidade de reações de óxido-redução *in situ* (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002).

O AM apresenta intensa absorção nos tecidos-alvo, quando irradiado no comprimento de onda entre 600-660 nm, apresenta ação antimicrobiana bastante eficaz, alta estabilidade e baixa toxicidade no tecido humano (WAINWRIGHT, 2015). O

AM é eficiente na produção de oxigênio singlete e, também, exibe eficiente fototoxicidade contra microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (WAINWRIGHT; McLEAN, 2017).

A agregação nos tecidos irradiados depende do meio e da concentração em que é utilizado, sendo que o estado de agregação determina os tipos de reações fotoquímicas que ocorrem, além de determinar a eficiência do tratamento com PDT.

Pode ser encontrado em solução aquosa de várias concentrações, como 0,01; 0,005; 0,0025% (SEVERINO, 2016).

As diversas moléculas das organelas citoplasmáticas são alvos biológicos da PDT e são atingidas pelas ROS sintetizadas durante a PDT. Entretanto, ao contrário dessas vantagens e do aumento da eficiência da PDT, é evidente que esta modalidade clínica ainda não está bem esclarecida.

As revisões sistemáticas e metanálises são ferramentas úteis, as quais podem ajudar a esclarecer alguns, mas não todos os pontos sobre uma determinada temática. Além de permitir a avaliação das evidências disponíveis e a probabilidade de que as conclusões tenham ou não algum risco de viés. As revisões sistemáticas estabelecem o uso de um processo estruturado para identificar todos os dados relevantes disponíveis para a questão da pesquisa. As revisões podem ser seguidas de meta-análises, que é um processo estatístico que fornece uma estimativa dos resultados de um grupo de estudos, e permite que esses resultados de diferentes grupos possam ser comparados (SENA, 2014).

Na comunidade científica, as pesquisas de modelos animais são usadas para elucidar a biologia normal, para melhorar a compreensão da patogênese das doenças e desenvolver as intervenções terapêuticas. Os modelos animais são valiosos, já que os experimentos são cuidadosamente projetados, interpretados e relatados (LANDIS, 2012).

As revisões sistemáticas são um importante método para apoiar as decisões sobre cuidados de saúde, pela sintetização, identificação e interpretação das

evidências disponíveis na literatura. Pela avaliação do risco de viés nos estudos selecionados, as revisões sistemáticas dão uma ideia da qualidade nas avaliações das evidências. Secundariamente, as revisões podem avaliar o risco da publicação de viés e identificar se existem diferenças fundamentais no projeto dos estudos animais e, conseqüentemente, nos testes clínicos. Finalmente, se a revisão inclui a meta-análise, pode fornecer uma estimativa agrupada da direção e da magnitude do efeito da intervenção. Tais estimativas gerais do efeito podem levar a conclusões alternativas a respeito da segurança ou eficácia da intervenção, do que aquelas baseadas na avaliação qualitativa dos estudos primários individuais (VRIES, 2015).

3. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem por objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura sobre o efeito da aPDT com azul de metileno em modelos animais de doença infecciosa, cujo desfecho tenha sido a quantificação microbiológica, excluindo-se os estudos em aplicações odontológicas.

3.1. Objetivos específicos

Coletar os parâmetros dosimétricos e seus valores nos artigos revisados.

Relacionar os dados coletados ao efeito microbiológico da aPDT.

4. METODOLOGIA

O estudo é uma revisão sistemática, compreendendo o período de 1995 a 2020, realizado de acordo com as diretrizes do PRISMA e seguindo as orientações CAMARADES para revisões em estudos em animais (Collaborative Approach to Meta-analysis and Review Data from Experimental Studies) (VRIES, 2015).

O termo *antimicrobial photodynamic therapy* (aPDT) foi usado para resumir todas as técnicas fotoquímicas relevantes, não invasivas e direcionadas a infecções contra organismos clinicamente relevantes, com a aplicação de um FS local não tóxico e irradiação com fótons no contexto de protocolos terapêuticos diversos. Essa revisão foi enviada para registro na plataforma PROSPERO, antes da extração dos dados. A pesquisa foi conduzida de acordo com os preceitos éticos locais e padrões da ética internacional de pesquisa e publicação.

4.1. Estratégias de busca

Em abril de 2020, buscas por artigos com estudos animais foram realizadas. A pesquisa foi limitada às línguas inglesa, portuguesa, francesa, italiana ou espanhola seguindo a estratégia P.I.C.O.: P= infectious conditions, I= Methylene Blue aPDT, C= placebo, placebo a PDT ou outro tratamento, bem como O= clinical and laboratory ameliorations, nas bases eletrônicas MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online) via PubMed e Embase (Excerpta Medica Database) via Wiley. Por fim, as pesquisas foram realizadas no banco de dados OpenGrey e na LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) via Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Também foram realizadas pesquisas manuais dos artigos relevantes.

Os termos utilizados na pesquisa bibliográfica foram: (“Methylene Blue/administration and dosage “Methylene Blue/pharmacokinetics” Mesh OR “Methylene Blue/organization and administration” MESH OR “Methylene Blue/pharmacokinetics” Mesh OR “Methylene Blue/pharmacology” Mesh OR “Methylene Blue/physiology” Mesh OR “methylene Blue/radiation effects” Mesh OR “Methylene Blue/standard” Mesh OR “Methylene Blue/therapeutics use” Mesh OR “Methylene Blue/therapy” Mesh OR (methylene blue AND standard protocol) OR (methylene blue AND exposure time AND photodynamic therapy) OR (methylene blue AND energy AND photodynamic therapy) OR (methylene blue AND radiant exposure)

OR (methylene blue AND irradiance) OR (methylene blue AND power density) OR (methylene blue AND power AND photodynamic therapy) OR (methylene blue AND operating mode) OR (pre-irradiation time AND methylene blue) OR (methylene blue OR methylthioninium chloride OR swiss blue OR blue n OR methylene blue OR methylthionine chloride OR prolene blue) AND (photodynamic therapy OR photo* OR photobiomodulation OR photochemotherapy OR photosensitizer OR photosensitization) AND (antimicrobial OR antibacterial OR infection OR infectious OR infected OR antiseptic OR disinfection OR microbial OR infec*).

4.2 Critérios de elegibilidade

4.2.1. Critérios de inclusão

1. Estudos com aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa Animal.
2. Estudos de modelo animal publicados após 1995 investigando o efeito *in vivo* da aPDT com azul de metileno em diferentes microrganismos.
 - 2.1 Estudos *in vivo* avaliando a eficácia da aPDT com azul de metileno (placebo ou não, controlado ou não). Como a aPDT muitas vezes não é usada com tratamento isolado, foram considerados estudos que permitam o uso associado da aPDT com outra terapia.
3. Revisão sistemática e metanálise cujos objetivos são similares aos propostos nesta revisão.
4. Revisões sistemáticas ou metanálises cujo objetivo tenha sido avaliar o uso da PDT, não apenas com azul de metileno, mas somente os resultados dos estudos usando azul de metileno serão considerados.
5. Animais de qualquer idade, gênero, estágio da doença, tempo de lesão, complicações associadas ou tempo de infecção.

4.2.2. Critérios de exclusão

1. Estudos em humanos ou *in vitro*.
2. Estudos epidemiológicos, protocolos sem resultados, dados não publicados, artigos em conferências, revisões históricas, cartas ao editor e revisões não-sistemáticas.
3. Estudos de relato de caso.

4. Estudos de aplicações orais.
5. Estudos sobre impacto da PDT usando outros FS ou que não mencionem o FS usado. Estudos realizados com partes extraídas dos animais e que apenas depois foram submetidos à aPDT, tais como dentes, produtos sanguíneos, saliva, pele, osso, músculo.
6. Estudos que usaram a aPDT com azul de metileno *in vitro* e apenas depois implantaram soluções bacterianas já tratadas nos animais para verificar a ação microbiológica.
7. Estudos com randomização do tipo “split-body”.

4.2.3. Resultados

Foram avaliados por tipo de infecção estudada.

4.2.4. Análise de viés

A análise qualidade dos estudos seguiu a diretriz ARRIVE para estudos em animais (SERT, 2020).

4.2. Extração de dados

Os dados extraídos e tabulados em tabela Excel foram:

1. Base de Dados.
2. Ano.
3. Autor.
4. Língua da publicação.
5. Registro prévio de protocolo.
6. Avaliação pelo comitê de ética local.
7. Tipo do estudo.
8. Objetivos do estudo.
9. Animal utilizado.

10. Objetivo antimicrobiano e tipo de infecção correlata em humanos.
11. Microrganismo tratado.
12. Randomização, alocação e cegamento.
13. Método de avaliação dos desfechos estudados.
14. Desfecho analisado.
15. Grupo tratamento e parâmetros da terapia.
16. Grupo controle.
17. Tempo de seguimento e análises.
18. Efeitos colaterais.
19. Perdas.
20. Outros vieses encontrados.
21. Conclusões dos autores.
22. Parâmetros da PDT utilizados.

4.3. Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas qualitativas dos dados coletados. Como não foram encontrados um mínimo de dois estudos com o mesmo material, mesma condição, terapia e resultados não foi possível realizar uma análise quantitativa (metanálise), inicialmente, programada.

5. RESULTADOS

Após a busca inicial, 1842 estudos relacionados ao tema foram encontrados. Após a remoção das duplicadas, 1041 não preencheram os critérios de inclusão iniciais e foram excluídos. Cerca de 670 estudos foram avaliados pelo do título e resumo incluindo-se cerca de 33 para leitura completa. Destes, 21 foram incluídos para extração de dados, totalizando uma amostra de 550 animais estudados (*Fluxograma Prisma*, Figura 5). Nós não encontramos nenhuma revisão sistemática ou metanálise relativa ao objetivo do nosso estudo. Em relação a extração de dados, todos os 2 estudos foram controlados, sendo 07 randomizados e 03 com cegamento. Nenhum estudo descreveu o método de randomização e cerca de 21 estudos realizaram análise estatística dos seus dados. Cerca de 12 estudos avaliaram infecções de pele, sendo 03 por *Leishmania amazonensis*, 07 infecções bacterianas e 02 estudos por fungo; 02 estudos avaliaram candidíase vaginal; 02 estudos avaliaram artrite piogênica; 01 estudo avaliou tricomoníase vaginal; 01 estudo avaliou onicomicose; 01 estudo avaliou cistite bacteriana; 01 estudo avaliou ceratite por fungo e 01 estudo avaliou rinosinusite bacteriana. As características detalhadas dos estudos e os parâmetros de estimulação encontrados estão apresentados nas Tabelas 1 a 5, abaixo.

Tabela 1: microorganismos – *Leishmania amazonensis*

AUTOR	BASE DADOS	ANO	LÍNGUA ESTUDO	REGISTRO PRÉVIO DO PROTOCOLO	AValiação COMITÊ DE ÉTICA	TIPO DE ESTUDO	ANIMAL UTILIZADO
Volpe	Pubmed	2018	inglês	Não relatado	O estudo foi submetido ao Comitê Local e aprovado de acordo com o registro número 158/2013 de 11/17/2013	Controlado pré-clínico animal	Ratos Balb/c
Peloi	Pubmed	2010	inglês	Não relatado	Aprovado pelo Comitê de Pesquisa de Cuidados Animais da Universidade Estadual de Maringá (registro número 028/2006 em 11/07/2006).	Controlado pré-clínico animal	Hamsters dourados
Cabral	PUBMED	2019	Ingês	Não relatado	Aprovado pelo CEP (protocolo 189/17).	Randomizado controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c

AUTOR	MÉTODO de RANDOMIZAÇÃO	N	MÉTODO DE CÁLCULO AMOSTRA	CEGAMENTO	CONDIÇÃO CLÍNICA ESTUDADA e MICROORGANISMO	LOCAL INFECÇÃO	DESFECHO PESQUISADO
Volpe	Não	25	Não relatado	Não relatado	Leishmaniose americana tegumentar / pele / Leishmania amazonensis	Pele	Evolução das lesões e determinação da carga parasitária
Peloi	Não	38	Não relatado	Não relatado	Leishmaniose americana cutânea / pele / Leishmania amazonensis	Pele	Avaliação da espessura da lesão e quantificação dos parasitas nos nódulos linfáticos e do baço.
Cabral	Não relatado	12	Não relatado	Não relatado	Almofada da pata infectada / pele / Leishmania amazonensis	Pele	Diminuição do tamanho da lesão e sensibilidade e nociceptiva, UFC.

UFC= Unidades Formadoras de Colônia.

AUTOR	GRUPOS TRATAMENTO E CONTROLE	TEMPO DE SEGUIMENTO	RESULTADOS ENCONTRADOS PARA CADA DESFECHO	EFEITOS COLATERAIS	CONCLUSÃO DO ESTUDO	FOTOSENSIBILIZADOR
Volpe	Grupo controle infectado e não tratado; Gluc + PDT tratado; só Grupo Gluc tratado com Glucantime®; Grupo PDT; Anfo + PDT tratado com anfotericina B e PDT; Grupo Ampho tratado com anfotericina B.	165 dias	Diferenças estatísticas não foram encontradas ($p > 0.05$) entre as medidas de volume e espessura das almofadas das patas infectadas nos grupos tratados qdo comparados com o grupo controle. Todavia, houve uma significativa redução ($p < 0.05$) na carga parasitária dos nódulos linfática poliptelial dos grupos Gluc+PDT, Gluc, PDT e Ampho, quando comparados com o grupo controle. na análise histológica das almofadas das patas infectadas, o grupo Gluc+PDT apresentou uma quantidade menor de ninhos de amastigotas e menor intensidade de infiltrado	Não relatado	Há validade no uso do Glucantime® combinado com PDT (AM + LED) para reduzir o tempo de tratamento ou a dose do medicamento, que é a primeira escolha de tratamento de Leishmaniose Cutânea, com consequente redução do risco de efeitos colaterais. Entretanto novos estudos deveriam ser realizados para avaliar as diferentes doses com Glucantime®, tão bem quanto periodicidade, tempo de irradiação, número total de sessões de PDT com AM para obter a cura clínica das lesões de LC.	Azul de metileno

			inflamatório quando comparado com grupos Gluc e PDT.			
Peloi	Grupo com AM metade em loção, metade em água sem LED; grupo óleo/água (O/A) loção com 10 nM AM; grupo tratado com solução aquosa 10 nM AM.	3 meses	O tratamento promoveu uma diminuição da espessura da almofada da pata infectada ($p=0.0001$) e redução da carga parasitária nos nódulos linfáticos regionais ($P=0.0007$) dos animais do grupo tratado com AM + LED. PDT usando AM + LED na ACL causada pela <i>L. amazonensis</i> mostra um forte efeito	Não relatado	PDT com AM + LED, é um sistema barato, promoveu significativa redução do tamanho da lesão, na carga parasitária na linfa dos nódulos linfáticos e curou as lesões em hamsters infectados experimentalmente com <i>L. amazonensis</i> .	Azul de metileno

			<p>fotodinâmico. Esta terapia é muito promissora, uma vez que é um sistema barato e o próprio paciente pode aplicar na sua ferida e na sua casa, sem a necessidade de assistência de técnico.</p>			
Cabral	<p>Controle (não irradiado); aPDT uma sessão (aPDT 1); e aPDT duas sessões (aPDT 2)(n =4/por grupo).</p>	4 semanas	<p>Embora os grupos aPDT1 e aPDT2 tenham mostrado carga parasitária similar após quatro semanas, duas sessões foram clinicamente melhor, especialmente considerando o processo inflamatório associado a LC. Nossos achados reforçam que PDT-AM como um tratamento custo-benefício efetivo no combate a LC.</p>	Não relatado	<p>Duas sessões de PDT reduziram significativamente o tamanho da lesão e a dor. A aPDT é capaz de modular o processo inflamatório.</p>	azul de metileno

Tabela 2 – microorganismos: bactérias em infecções de cavidades profundas

AUTOR	BASE DADOS	ANO	LÍNGUA DO ESTUDO	REGISTRO PROTOCOLO PRÉVIO	AValiação Comitê DE ÉTICA	TIPO DE ESTUDO	ANIMAL UTILIZADO
Tanaka	PUBMED	2012	Inglês	Não relatado	Aprovado pelo subcomitê de cuidado em pesquisa animal de (IACUC), do Hospital Geral de Massachusets, EUA (protocolo 2005N000111) e o quadro de revisão institucional para assuntos de cuidados de animais na faculdade de Medicina de Defesa Nacional, Japão (protocolo 08007 e 11008).	Controlado pré-clínico animal	Ratos C57BL/c
Tanaka	PUBMED	2013	inglês	não relatado	Aprovado pelo subcomitê de cuidado em pesquisa animal de (IACUC), do Hospital Geral de Massachusets, Boston, MA, e Quadro de Revisão Institucional para Assuntos de Cuidados de Animais na Faculdade de Medicina de Defesa Nacional, Japão.	Controlado pré-clínico animal	Ratos C57BL/6
Huang	PUBMED	2018	Inglês	Não relatado	Comitê Institucional de Cuidado e Uso Animal no MGH - protocolo número #2015N000073.	Controlado pré-clínico animal	Ratos Sprage-Dawby

Shih	PUBMED	2011	Inglês	Não relatado	Diretrizes institucionais em relação a experimentação animal foram seguidas e os animais foram tratados de acordo com o Estatuto ARVO para o Uso de Animais em Pesquisa Oftálmica e de Visão.	Randomizado controlado pré-clínico animal	Coelho branco Neo Zelandês
------	--------	------	--------	--------------	---	---	----------------------------

AUTOR	MÉTODO de RANDOMIZAÇÃO	N	METODO DE CÁLCULO AMOSTRA	CEGAMENTO	CONDIÇÃO CLÍNICA ESTUDADA e MICROORGANISMO	LOCAL INFECÇÃO	DESFECHO PESQUISADO
Tanaka	Não	NA	Não relatado	Não relatado	Artrite Streptococcus aureus resistente a meticilina / pioartite	Articulação	Inativação do Streptococcus aureus resistente a meticilina
Tanaka	Não	30	Não relatado	Não relatado	Monoartrite / Streptococcus aureus resistente a meticilina	Articulação	Redução de UFC
Huang	Não	32	Não relatado	Não relatado	Cistite aguda / Escherichia coli	Bexiga / uretra	Diminuição das UFC
Shih	Não relatado	21	Não relatado	Não relatado	Ceratite / Mycobacterium	Olho	Redução de UFC

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

AUTOR	GRUPOS TRATAMENTO E CONTROLE	TEMPO DE SEGUIMENTO	RESULTADOS ENCONTRADOS PARA CADA DESFECHO	EFEITOS COLATERAIS	CONCLUSÃO DO ESTUDO	FOTOSSENSIBILIZADOR
Tanaka	Grupo não tratamento (NT), que recebeu nenhuma terapia antibiótica nem PDT; grupo LZD sozinho; grupo VCM sozinho; grupo combinação PDT + LZD; grupo combinação VCB + PDT; e grupo PDT sozinho.	7 dias	PDT sozinha foi significativamente mais efetiva, enquanto LZD sozinho foi inefetivo e VCM sozinho mostrou algum benefício. Surpreendentemente, a adição de LZD ou VCM reduziu os efeitos da terapêutica da PDT sozinha (P 0.05). Considerando que PDT neste modelo de rato estimulou neutrófilos ser antibacteriano, apesar de ativamente matar as bactérias, nós propusemos que LZD e VCM podem inibir a ativação das citocinas inflamatórias sem erradicar as bactérias, e deste modo, reduzir efeito terapêutico da PDT.	Não relatado	Os antibióticos adicionais para SARM, lizolida e vancomicina, reduziram o efeito terapêutico da PDT, superior aos antibióticos isoladamente, usando AM em um modelo animal de artrite bacteriana. A observação pode ser explicada pela ação da lizolida e da vancomicina em reduzir citocinas inflamatórias e reduzir o acúmulo de neutrófilos dentro da articulação.	Azul de metileno
Tanaka	Grupo - IR, que recebeu solução de AM sem subsequente fotoirradiação; o grupo - FS, que recebeu fotoirradiação sem injeção de AM; grupo - FS - IR que não recebeu nem	7 dias	Embora Th-PDT não pudesse demonstrar diretamente morte bacteriana, os neutrófilos estavam acumulados no espaço da articulação infectada após PDT, a artrite SARM foi diminuída. Com o regime de pré-condicionamento pré-PDT, os neutrófilos estavam rapidamente	Não relatado	Esta é a primeira demonstração de resposta imune inata protetora contra um patógeno bacteriana produzido pela PDT.	Azul de metileno

	AM nem irradiação.		acumulados dentro da articulação imediatamente após a inoculação bacteriana e crescimento bacteriano foi suprimido e o estabelecimento da infecção foi inibido.			
Huang	Grupo b) (n =8) - AM + IP sem luz (grupo escuro). Grupo c) (n =8) - AM + IP - sem luz. Grupo d) (n =8) - AM + IP + laser. Controle: Grupo a) (n =8) - controle não tratado.	Não relatado	O grupo d (AM + IP + aPDT) mostrou completo sucesso no tratamento da infecção.	Não relatado	A combinação de AM/IP foi efetiva	Azul de metileno
Shih	Grupo sem nenhum tratamento; grupo tratamento amicacina; e grupo tratamento PDT combinada com amicacina.	17 dias	Nos testes in vitro, a contagem de bactérias teve uma redução de 2-log imediatamente após tratamento com PDT a 100 J/cm ² , com AM 103%. Após PDT a 100 J/cm ² com 102 % de AM, quase nenhuma bactéria viável foi detectada. PDT teve um efeito sinérgico antimicrobiano com antibióticos. A fototoxicidade ocorreu no citoplasma da célula primeiro e depois rompeu a parede micobacteriana por lise. No modelo queratite no coelho, PDT combinada resultou em	Não relatado	PDT tem o potencial de prover efeito antimicrobiano adjuvante quando combinada com tratamento antibiótico para infecção micobacteriana intratável.	Azul de metileno

			significante menos perda de carga bacteriana (P 0.01), que no grupo amicacina.			
--	--	--	--	--	--	--

Tabela 3 – microorganismo: bactérias em infecções superficiais

AUTOR	BASE DADOS	ANO	LÍNGUA DO ESTUDO	REGISTRO PROTOCOLO PRÉVIO	AValiação Comitê de Ética	TIPO DE ESTUDO	ANIMAL UTILIZADO
Zolfaghari	PUBMED	2009	Inglês	Não relatado	Aprovação do Comitê de Ética Local	Randomizado controlado pré-clínico animal	Ratos pretos C57
Nascimento	PUBMED	2015	Inglês	Não relatado	Aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Animais, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil (protocolo número 171/2012) e foi autorizado pela Autoridade de Vida Selvagem Brasileira (SISBIO número 44274 - 1).	Randomizado controlado pré-clínico animal	Ratos (Rattus)
Ragas	PUBMED	2010	Inglês	Não relatado	Aprovado pelo Subcomitê de Pesquisa de Cuidados Animais (SPCA) do Hospital Geral de Massachussetts e atendeu às diretrizes do Instituto Nacional de Saúde.	Controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c
Rineh	PUBMED	2017	Inglês	Não relatado	Aprovado pelo Subcomite de Pesquisa de Cuidados Animais (SPCA) do Hospital Geral de Massachussetts (MA, EUA) e estava de acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde (INS).	Controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c
El-Khordagui	PUBMED	2017	Inglês	Não relatado	Comitê de Uso e Cuidados Animais (CUCA) da Universidade de Farmácia,	Randomizado controlado pré-clínico animal	Ratos Wistar

					Universidade de Alexandria.		
Fila	PUBMED	2016	Inglês	Não relatado	Comitê de Cuidados Animais (CCA) da Universidade de Health Network - Toronto - ON - Canada - Protocolo AUP 3303.2	Randomizado controlado pré-clínico animal	Modelo rato Murine
Krasnoselskiy	PUBMED	2019	Inglês e russo	Não relatado	Convenção para Proteção de Animais Vertebrados usada para propósito experimental ou outro científico.	Controlado pré-clínico animal	Ratos WAG

AUTOR	MÉTODO de RANDOMIZAÇÃO	N	METODO DE CÁLCULO AMOSTRA	CEGAMENTO	CONDIÇÃO CLÍNICA ESTUDADA e MICROORGANISMO	LOCAL INFECÇÃO	DESFECHO PESQUISADO
Zolfaghari	Não relatado	NA	Não relatado	Não relatado	Streptococcus aureus resistente a meticilina em feridas superficiais e excisionais.	Pele	Redução das UFC e efeito da PDT na temperatura das feridas.
Nascimento	Não relatado	10	Não relatado	Não relatado	Dermatite em almofada da pata (bumblefoot) / E. coli é o microorganismo mais comumente encontrado. Outra bactéria Gram-negativa tal como P. mirabilis, Pseudomonas spp., P. aeruginosa, e Morganella morganii, e bactérias Gram-positivas tais como STAPHYLOCOCCUS SPP., S. aureus e Enterococcus spp.	Pele	Diminuição do tamanho da lesão.

Ragas	Não	12	Não relatado	Não relatado	Queimaduras infectadas / A. baumannii	Pele	Redução das UFC.
El-Khordagui	Não relatado	12	Não relatado	Não relatado	Feridas no dorso de cada rato / pele / Staphylococcus aureus ATCC6538P e Staphylococcus aureus resistente a meticilina.	Pele	Diminuição do tamanho das feridas, UFC
Fila	Não relatado	51	Não relatado	Não relatado	Feridas infectadas/ pele / Staphylococcus aureus resistente a meticilina e Pseudomonas aeruginosa.	Pele	Diminuição das UFC
Krasnoselskiy	Não	50	Não relatado	Não relatado	Úlcera de pele infectada / Pseudomonas aeruginosa.	Pele	Diminuição das UFC e medida do tamanho da lesão
Rineh	Não	NA	Não relatado	Não relatado	Ferida infectada por Streptococcus aureus resistente a meticilina (SARM) / pele	Pele	Inativação do Streptococcus aureus resistente a meticilina, Diminuição das UFC.

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

AUTOR	GRUPOS TRATAMENTO E CONTROLE	TEMPO DE SEGUIMENTO	RESULTADOS ENCONTRADOS PARA CADA DESFECHO	EFEITOS COLATERAIS	CONCLUSÃO DO ESTUDO	FOTOSSENSIBILIZADOR
Zolfaghari	Grupos: AM sozinho, luz sozinho e grupo controle não tratado recebeu nenhum AM ou iluminação.	Não relatado	Seguindo a irradiação de ferida com 360 J/cm ² de luz laser (670 nm) na presença de 100mm/ml de AM, foi observada redução de 25% no número viável de ESARM-16. Isto foi independente do aumento de temperatura das feridas associada com o tratamento. Exames histológicos das feridas revelaram nenhuma diferença entre feridas tratadas com PDT e feridas não tratadas, todas as quais mostraram o mesmo grau de infiltrado inflamatório.	Não encontrado	PDT é efetivo como agente antimicrobiano ativado pela luz, para tratar SARM em excisões das feridas de pele.	Azul de metileno
Nascimento	Grupos terapia fotodinâmica (PDT) e antibióticos (ATB).	total observação no período de 84 dias.	Houve diferenças significantes no padrão de cicatrização e média do tempo de cura dos grupos PDT e ATB (63,62% vs 9,09% e 42 vs 70 dias, respectivamente).	Não relatado	Os achados deste estudo comprovam a efetividade da PDT para tratamento de lesões de pele estágio III	Azul de metileno
Ragas	Grupo controle escuro; grupo tratado PDT.	15 dias	Todos os corantes foram efetivos in vitro contra a <i>A. baumannii</i> após irradiação de luz vermelha de 30 J/cm ² , 635 - 652 nm, ter sido entregue, com maior morte celular efetiva quando o corante foi mantido em solução. O NAM foi o mais efetivo dos quatro corantes, alcançando uma redução de 3.2-log da luminescência da bactéria durante a PDT in vivo, pós 360 J/cm ² e uma dose de corante de 8--mM. Além disso, uma redução significativamente estatística da área abaixo da curva do tempo bioluminescente dos ratos na PDT-tratada foi observada mostrando que a infecção não regrediu após PDT.	Não relatado	O novo azul de metileno é um corante fenotiazínico útil na inativação de bactérias multi-resistentes como o <i>A. baumannii</i> e é capaz de reduzir mais que 6-log a sobrevivência da bactéria após a irradiação de 30 J/cm ² de luz vermelha com concentração do corante de 10 ou 2 mM em infecção de pele pós queimadura in vivo. Como o AM e o azul de toluidina já são FS na prática clínica, e baseado no padrão de eficácia obtido neste estudo, pode ser interessante testar NAM como um potencial FS na ampla variedade de infecções localizadas.	Novo azul de metileno
Rineh	Grupo que recebeu AM + LUZ; grupo que serviu como controle escuro para	não relatado	Composto 12 mostrou captação aumentada dentro das células <i>S. aureus</i> e aumentou a atividade da aPDT e efeitos de cura da ferida (relativo ao AM) em um modelo animal de abrasão em ferida infectada por SARM. O estudo suporta um	Não relatado	Este estudo demonstra que anexando um potencializador ao FS pode-se aumentar a eficácia da PDT, ambos in vitro e in vivo.	Azul de metileno e INF55(Ac)en-MB 12.

	INF55(ac)en-AM 12 (12 + sem luz); e grupo que recebeu 12 + luz.		novo combinado para tratamento localizado de infecções multidrogas resistentes SARM e abre o caminho para maior exploração de estratégia híbrida FS-EPI na PDT.			
El-Khordagui	Grupo 2 (n =3) - tratado com luz vermelha. Grupo 3 (n = 3) - tratado com solução de AM e luz vermelha. Grupo 4 (n =3) - tratado com AM-PHB/PEG nanofibras eluentes e luz vermelha. Controle: não tratado (n =3).	15 dias	A abordagem combinada FS-eluente NFs/aPDT provou ser eficaz no tratamento de excisão feridas inoculadas por SAST, em um modelo de rato imunocomprometido. Isto foi verificado pelos estudos morfológicos, morfométricos, microbiológicos, histopatológicos e RT-PCR. A inclusão de FS-eluente em NFs como um ativo adicional da aPDT gera um combinado não antibiótico antimicrobiano abordagem de regeneração celular com grande potencial de cura da ferida e aplicações biomédicas.	Não relatado	A aPDT cominada com AM-PHB/PEG NFs aumentou enormemente a cura de feridas infectadas por <i>S. aureus</i> e SARM, quando comparada aos tratamentos individuais com AM + luz vermelha ou luz vermelha somente.	Azul de metileno
Fila	Grupo II (n = 3) - infectado, coberto com Tegaderm, sem PDT; Grupo III (n = 3) - infectado, sem cobertura, sem aPDT; Grupo IV (n =3) - infectado, com remoção de cobertura no segundo dia, sem aPDT; Grupo V (n maior que 3) - infectado com ambos os microorganismos, aPDT; e	5 dias	Todos os FSs mostraram diminuição na quantidade de UFCs.	Não relatado	A significante redução clínica da carga bacteriana causa demora na ativação total da resposta inflamatória e redução do risco de desenvolver sepse.	Rose Bengal (RB), porfirina TMPyP, novo azul de metileno (NAM) e TLD1114.

	Grupo VI avaliou a eficácia da aPDT versus LLLT. Grupo controle (n = 3) - não infectado.					
Krasnoselski y	Grupo III (n=20) - úlcera de pele + infecção + PDT. Controle: grupo controle (n =15) - úlcera de pele. Grupo controle II (n =15) - úlcera de pele + infecção.	52 dias	Grupo controle I - a área de secção vertical reduziu acima de 73% no dia 30, e 51% no dia 52, comparada ao valor base (dia 14). Grupo controle II - a área de secção vertical das úlceras infectadas por radiação reduziu 30% comparada ao valor base, enquanto a área de secção vertical das úlceras não tratadas foi reduzida 50% no dia 52. Grupo III - a cavidade de área de secção vertical, nas úlceras infectadas, estava ausente devido a completa cura das úlceras de radiação.	Não relatado	A presença de <i>Pseudomona aeruginosa</i> em úlceras causadas por radiação podem causar aumento da área da cavidade da ferida comparada à úlcera de radiação não infectada e significante inibição do seu processo de cura. Fatores adicionais da infecção causam diminuição de 20% da atividade do processo reparativo na úlcera de radiação comparados aos valores da ferida não infectada. O tratamento da PDT favoreceu a cura em média um mês antes do que ocorreu nos grupos controle.	Azul de metileno

Tabela 4: microorganismos – fungos em infecções superficiais

Autor	Base Dados	Ano	Língua do Estudo	Registro Protocolo Prévio	Avaliação Comitê de Ética	Tipo de Estudo	Animal Utilizado
Tawfik	PUBMED	2016	inglês	Não relatado	Aprovação do Comitê de Ética Local	Controlado pré-clínico animal	Coelhos
de Santi	PUBMED	2018	inglês	não relatado	UNINOVE 0025/2013. Comitê local	Controlado pré-clínico animal	Ratos Balb/c
Machado de Sena	PUBMED	2014	inglês	Não relatado	Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN-CNEN/SP.	Controlado pré-clínico animal	Ratos Balb/c
Fonseca	PUBMED	2019	Inglês	Não relatado	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais - Protocolo número 140/2017.	Controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c
Li	PUBMED	2019	Inglês	Não relatado	Comitê de Ética Institucional para Animal	Controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c
Dai	PUBMED	2011	Inglês	Não relatado	2005N000111 Comite local	Controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c
Krespi	PUBMED	2009	Inglês	Não relatado	Aprovação do Comitê de Ética Local	Controlado pré-clínico animal	Coelho branco Neo Zelandês

AUTOR	MÉTODO de RANDOMIZAÇÃO	N	MÉTODO DE CÁLCULO AMOSTRAL	CEGAMENTO	CONDIÇÃO CLÍNICA ESTUDADA e MICROORGANISMO	LOCAL INFECÇÃO	DESFECHO PESQUISADO
Tawfik	Não	80	Não relatado	Não relatado	Onicomicose causada por Trichophyton mentagrophytes.	Unha	Diminuição da carga fúngica
Machado de Sena	Não	77	Não relatado	Cegamento único	Candidíase vaginal / Candida albicans	Vagina	Determinar UFC/ml e a resposta inflamatória clínica relacionada a presença de C. albicans na candidíase vaginal
de Santi	Não	37	Não relatado	Não relatado	Candidíase vulvovaginal / Candida albicans	Vagina	Diminuição das UFC.
Fonseca	Não	40	Não relatado	Não relatado	Tricomoníase experimental vaginal / Trichomonas vaginalis	Vagina	Diminuição das UFC T. vaginalis e danos causados aos trofozoítos sensitivos e resistentes ao metronidazol (MTZ).

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

AUTOR	GRUPOS TRATAMENTO E CONTROLE	TEMPO DE SEGUIMENTO	RESULTADOS ENCONTRADOS PARA CADA DESFECHO	EFEITOS COLATERAIS	CONCLUSÃO DO ESTUDO	FOTOSENSIBILIZADOR
Tawfik	Grupo sem infecção; grupo infectado com Trichomonas mentagraphytes + PDT para terapia fotodinâmica com composto & LED vermelha; grupo infectado com Trichomonas mentagraphytes + azul de metileno & LED vermelha (AM-PDT); (n=10), grupo infectado com Trichomonas mentagraphytes para irradiação somente com luz; LED verde e LED vermelho; grupo infectado com Trichomonas mentagraphytes com nanopartículas douradas & LED verde (nanopartículas douradas + luz) e último grupo com aplicação tópica de solução de FS (FSs) usada sozinha.	coelhos dos grupos controle sacrificados nos dias 5, 9, 15 e 20 após inoculação. Coelhos dos grupos tratados sacrificados 48 horas após quarta sessão e biópsias foram realizadas.	Recuperação da infecção aproximadamente de 96% em nanopartículas douradas + grupo luz, por volta de 40% na PDT - AM e 34% na PDT composta. Os achados observados confirmaram diminuição da apoptose, todavia pequenos achados de nanopartículas douradas foram detectados no cérebro e fígado.	Não relatado	O uso da MB-aPDT mediada por nanopartículas é ferramenta promissora no tratamento da onicomiose.	Azul de metileno
Machado de Sena	Grupo saudável; Grupo SFB; Grupo AM; Grupo laser e Grupo PDT.	96 horas após tratamento	PDT reduziu significativamente C. albicans após os dois protocolos testados, entretanto, porcentagem da área de células inflamatórias estava significativamente reduzida apenas com duas sessões de PDT. PDT-AM e luz laser é uma terapia promissora para VC. Está apta para diminuir infecção fúngica no biofilme e sinais inflamatórios	Não relatado	Este trabalho é pioneiro em compreender os efeitos da PDT na vaginite induzida pela C. albicans. Mostra que é possível reduzir a infecção fúngica e seus	Azul de metileno

			associados com VC em vaginite de modelo animal		sinais inflamatórios associados. Este fato é muito importante para explorar a terapia em humanos, desde que os sintomas da doença na mulher seja principalmente devido a inflamação causada pelos fungos ao invés da própria infecção.	
de Santi	Grupo 1 tratado com AM 100 µM e laser 660 nm. Grupo 2 tratado com PpNetNI 10 µM, com LED 630 nm. Controle: não tratado (n =8).	8 dias (0-7)	A aPDT com AM e PpNetNI alcançou redução na quantidade fúngica durante sete dias. O grupo controle não alcançou redução na quantidade fúngica. A PDT-MB foi efetiva dos dias 0-7 em reduzir UFCe a PpNetNI não reduziu UFC no dia 0, mas preveniu crescimento no dia 7.	Não relatado	O uso da PDT é uma opção para tratar candidíase vaginal infectada pela <i>C. albicans</i> numa significativa redução na quantidade de <i>C. albicans</i> . Ambos FS, AM e PpNetPI, foram efetivos em prevenir infecção durante 7 dias.	Azul de metileno e fotorporfirina IX
Fonseca	Grupo CTR MTZ (n = 8) - infecção + MTZ; Grupo luz controle (n = 8) - infecção + luz vermelha 68,1 J/cm ² .	4 dias	A PDT reduziu significativamente a infecção nos animais tratados com única sessão, sendo tão	Não relatado	PDT reduziu significativamente a infecção nos animais	Azul de metileno 0,25%

	<p>Grupo AM (n =8) - infecção + AM 100 µM; Grupo aPDT (n =8) - infecção + AM 100 µM + LED 68,1 J/cm². Controle: Grupo CTR infectado somente (n =8), não tratado.</p>		<p>eficiente quanto o grupo MTZ.</p>		<p>tratados, comparado aos grupos controles, tão eficiente como o metronidazol. Reforçando a viabilidade da aPDT para tratamento da tricomoníase.</p>	
--	---	--	--	--	---	--

Tabela 5: microorganismos – infecções fúngicas

AUTOR	BASE DADOS	ANO	LÍNGUA DO ESTUDO	REGISTRO PROTOCOLO PRÉVIO	AValiação COMITÊ DE ÉTICA	TIPO DE ESTUDO	ANIMAL UTILIZADO
Li	PUBMED	2019	Inglês	Não relatado	Comitê de Ética Institucional para Animal	Controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c
Dai	PUBMED	2011	Inglês	Não relatado	2005N000111 Comitê local	Controlado pré-clínico animal	Ratos BALB/c
Krespi	PUBMED	2009	Inglês	Não relatado	Aprovação do Comitê de Ética Local	Controlado pré-clínico animal	Coelho branco Neo Zelandês

AUTOR	Método de RANDOMIZAÇÃO	N	METODO DE CÁLCULO AMOSTRAL	CEGAMENTO	CONDIÇÃO CLÍNICA ESTUDADA e MICROORGANISMO	LOCAL INFECÇÃO	DESFECHO PESQUISADO
Li	Não	NA	Não relatado	Cegamento único	Esporotricose / Pele / Sphorothrix schenckii, S. globosa.	Pele	Diminuição das UFC
Dai	Não	11	Não relatado	Não relatado	Feridas por abrasão de pele infectadas / Candida albicans	Pele	Diminuição das UFC.
Krespi	Não	12	Não relatado	Não relatado	Rinosinusite aguda / Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas arginosa, Streptococcus aureus.	Seios nasais	Diminuição das UFC

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

AUTOR	GRUPOS TRATAMENTO E CONTROLE	TEMPO DE SEGUIMENTO	RESULTADOS ENCONTRADOS PARA CADA DESFECHO	EFEITOS COLATERAIS	CONCLUSÃO DO ESTUDO	FOTOSENSIBILIZADOR
Li	Grupo itraconazole. grupo PDT. Grupo itraconazole + PDT. Controle: grupo tratado com cloreto de sódio 0.9%.	30 dias	O tamanho da lesão no dia 30 estava menor que no dia 20, em todos os grupos. O grupo itraconazole + PDT mostrou redução mais notável, na qual a pele de alguns ratos tornou-se normal, antes do dia 20. Grupo itraconazole + PDT apresentou resultados negativos para cultura de fungos no dia 30; nos outros grupos - controle, itraconazole e PDT - os resultados para cultura de células foi positivo. Ensaios toxicológicos realizados nos dias 0, 20 e 30, usando ELISA mostraram que as funções renais e hepáticas estavam normais.	Não relatado	PDT com azul de metileno é uma terapia adjuvante efetiva para infecções de <i>Sporothrix</i> resistente.	Azul de metileno
Dai	Grupo PDT profilaxia foi tratado por 30 min após infecção. Grupos infectados com 10x6 e 10x7 UFCs foram tratados com NAM 400 µM, 78 J/cm ² , 30 min após infecção.	6 dias (0-5)	PDT realizada 30 min após infecção mostrou crescimento das células fúngicas maior em 10x7 UFC, que 10x6 UFC. PDT realizada 24 h após infecção mostrou nenhum crescimento e boa redução da bioluminescência em 10x7 UFC. Grupo controle (não irradiação) não apresentou redução	Não relatado	Novo azul de metileno é mais efetivo que AM ou AT na PDT para tratar <i>C. albicans</i> .	Sal fenotiazínico Azul de Toluidina (TBO), azul de metileno (AM), Novo azul de metileno (NAM).

	Grupo infectado com 10x7 UFC foi tratado 24 h após infecção, 400 µM, dose de luz vermelha 120 J/cm ² . Controle: não tratado.		na bioluminescência fúngica.			
Krespi	grupo I (n=4) - laser de diodo infravermelho 940 nm. Grupo II (n=5)- desinfecção fotoativada (DFA) 635 nm. Controle: grupo controle (n=3) - coelhos sem rinosinusite e um coelho com infecção não tratada.	10 dias	Carga bacteriana diminuiu em todos os animais de ambos os grupos tratados, indicando que uma única terapia a laser foi capaz de reduzir as colônias bacterianas.	Não relatado	Significante redução bacteriana foi alcançada com ambos NIR e PAD em estudos animais de rinosinusite bacteriana aguda (RSBA).	Azul de metileno

6. DISCUSSÃO

Este estudo é uma revisão sistemática da literatura, do período de 1995 a 2020, realizada de acordo com a Diretriz PRISMA, sobre o uso da aPDT-AM em modelos animais de infecções a fim de atualizar as informações sobre o uso da aPDT-AM para o tratamento de infecções de diferentes etiologias e encontrou resultados positivos em relação aos seus efeitos como terapia antimicrobiana para infecções com correlação clínica humana significativa.

Em relação aos resultados, todos encontraram resultados positivos favorecendo o uso da aPDT-AM para as infecções estudadas, mostrando superioridade da aPDT em relação aos grupos paralelos, para um ou mais dos resultados estudados. Juntos, esses estudos sugeriram que a aPDT-AM pode ter benefícios adicionais no tratamento clínico das condições infecciosas que foram estudadas.

Apesar disso e do fato de todos os estudos serem controlados, os grupos controle incluíram muitos tipos diferentes de outras terapias como tratamentos padrão conhecidos ou outras terapias farmacológicas. Além disso, todos os estudos utilizaram métodos padronizados e objetivos para a avaliação das infecções e apenas 05 deles não realizaram análise estatística. Nos 21 estudos que utilizaram análise estatística formal de seus resultados, houve resultados favoráveis ao uso da PDT.

Em especial, os melhores resultados foram obtidos nos estudos sobre infecções micóticas e bacterianas superficiais.

De fato, estudos prévios em humanos já têm demonstrado efeitos positivos do uso da aPDT em infecções fúngicas superficiais. Em 2014, Figueiredo Souza et al. demonstrou em pacientes portadores de onicomicose tratados com aPDT melhora microbiológica em 1 e 12 meses após tratamento, em relação aos pacientes que usaram fluconazol sem aPDT. Scwingel et al. demonstrou que pacientes infectados com HIV e candidíase oral apresentaram

melhorias clínicas e laboratoriais após 1 mês de tratamento com aPDT em relação a pacientes que utilizaram fluconazol isoladamente. Ambos os estudos mostraram em humanos que aPDT associada ao fluconazol parece ser superior ao fluconazol isoladamente para o tratamento de um infecções fúngicas superficiais não complicadas. Corroborando nossa revisão outras revisões sistemáticas também já demonstraram em estudos in vitro e humanos que as abordagens da aPDT são promissoras para o tratamento de patógenos fúngicos em infecções superficiais (Baltazar et. al, Boltes Cecatto et. al.). Em 2016, Bhatta et al. publicou uma revisão sistemática sobre o uso de aPDT específica para o tratamento de onicomicose, encontrando também resultados positivos.

Nesta revisão, os resultados de maior qualidade e de maior número de animais analisados correspondem aos estudos sobre o uso da aPDT em infecções de pele bacterianas superficiais. Estes resultados corroboram os estudos clínicos controlados publicados em humanos com o uso da PDT em infecções de pele. Em relação aos estudos que avaliaram o uso de aPDT no tratamento de úlceras diabéticas infectadas, Tardivo et al. encontrou diferenças estatísticas na redução de incidência de amputações, e uma maior sobrevivência sem amputação de pacientes diabéticos portadores de úlceras infectadas de pele e tratados com aPDT. Eles usaram uma solução mista de dois fotossensibilizadores (azul de metileno 1% e azul de toluidina 1%), e duas fontes de luz (uma luz halógena branca e um diodo emissor de luz). Carrinho et al. demonstrou que a aPDT promoveu uma diminuição significativa dos tamanhos das feridas infectadas diabéticas tratadas, o que não foi observado no grupo controle. Mas apesar desses resultados em estudos humanos sugerirem que a aPDT é promissora no tratamento de infecções de pele, ainda não há consenso sobre os melhores parâmetros a serem usados na terapia, seja em estudos humanos, seja in vivo. Neste sentido, esta revisão é pioneira em discutir os estudos animais em infecções de pele tratadas com a PDT para entender quais são os melhores parâmetros terapêuticos encontrados em animais que podem ser testados e pesquisados em humanos.

Em nossos resultados sobre o tratamento das infecções de pele bacterianas, encontramos 04 estudos que realizaram apenas 01 sessão, 02

estudos que não relataram o número de sessões e 01 estudo com 03 sessões de terapia, demonstrando que mesmo em curtos períodos de tempo de terapia já pode haver benefícios. Em relação aos parâmetros da PDT houve grande variabilidade nos estudos revisados e esses resultados estão resumidos na Tabela 6. Em relação aos estudos que reportaram dados, a exposição radiante variou de 10 a 360 J/cm²; o AM foi diluído em solução salina ou água destilada, o tempo de irradiação variou de 40 a 2200 segundos. Apenas 01 estudo relatou a irradiância que foi de 3,3 W/cm². É também importante salientar que nem todos os estudos avaliaram modificações na cicatrização, inflamação ou tamanho das lesões além da quantificação bacteriológica. Mais ainda dois estudos demonstraram melhora nos parâmetros bacteriológicos sem melhora na cicatrização. Este aspecto impacta negativamente estes resultados já que o tratamento da infecção nestas lesões visa, além de evitar a disseminação da infecção, também acelerar o processo de cicatrização. Seria, portanto, indispensável que estes estudos tivessem avaliado o processo de cicatrização das úlceras de pele concomitantemente a melhora do processo infeccioso. A aPDT ideal nestas lesões deve encontrar resultados positivos em ambos os desfechos. Apenas 05 estudos encontraram modificação positiva em ambos os parâmetros.

É importante salientar que o efeito fotodinâmico depende do oxigênio e em geral pacientes portadores de lesão de pele e ao mesmo tempo doença arterial periférica (DAP) talvez apresentem resultados de menor magnitude que os aqui encontrados em modelos animais de úlceras infectadas não vasculares. Especificamente em lesões diabéticas, em 2012, Brown S. et. al publicou uma revisão crítica mostrando que os estudos clínicos sobre o uso de aPDT para tratar úlceras diabéticas foram principalmente em fases pré-clínicas ou clínicas I ou II. Nenhum estudo clínico de fase III foi encontrado nesta área pelos autores, o que reforça a importância dos resultados desta revisão, já que mesmo na úlcera diabética não existem ainda parâmetros definidos de resposta a PDT.

É interessante também destacar os 03 estudos que avaliaram o uso da PDT no tratamento da *Leishmania amazonensis*. Estes estudos demonstraram, tanto diminuição da carga parasitária, quanto diminuição no tamanho das lesões,

sugerindo que a PDT pode ser usada como adjuvante no tratamento da leishmaniose tegumentar diminuindo o tempo total do tratamento formal.

Já nos estudos que avaliaram o uso da PDT em infecções profundas os resultados encontrados, ainda que positivos, são de menor magnitude e demonstram que outras técnicas terapêuticas devem ser adicionadas a PDT para melhorar os resultados desta terapia em infecções não superficiais.

O AM tem um histórico de segurança em seu uso na medicina. O uso extensivo deste corante para identificar fístulas não foi associado a efeitos adversos, e pode-se assumir com segurança que a toxicidade local não ocorre com a maioria dos tecidos.

Estudos em animais sobre o metabolismo e a toxicologia do AM mostraram que ele é rapidamente excretado. No entanto, episódios de toxicidade têm sido relatados e parecem ser dependentes da via de administração. O AM é tóxico para os tecidos neurais e uma injeção epidural pode causar paraplegia. Os efeitos em neonatos incluem anemia hemolítica, dificuldade respiratória, fototoxicidade e atresia intestinal (SCHULTZ et al.). Essas toxicidades foram relatadas principalmente *in vitro* ou em estudos com animais e os reais efeitos tóxicos em humanos precisam ser melhor esclarecidos.

Finalmente, embora os resultados tenham sido convergentes e positivos para aPDT, cada estudo utilizou parâmetros de terapia muito diferentes. Nesse sentido, como resultado, não foi possível determinar os melhores parâmetros relacionados a aPDT com AM em doenças infecciosas, ainda que os resultados apontem direcionamentos futuros. De fato, os estudos anteriores *in vitro* já demonstraram uma correlação positiva e diretamente proporcional entre o valor da concentração do AM e sua capacidade de produzir morte celular, sendo este um parâmetro importante. Assim como o tempo de irradiação e a intensidade da luz. Essa regra geral vale tanto para toxicidade como para seus efeitos terapêuticos. Portanto, é urgente estudos que realizem comparações em um mesmo estudo em relação a concentrações utilizadas, tempo de irradiação e intensidade da luz

Esta revisão sistemática sugere que estudos clínicos controlados randomizados sejam realizados na avaliação da PDT em infecções superficiais por fungos e para as infecções bacterianas de pele e por Leishmaniose Tegumentar, comparando a PDT com os tratamentos padrão conhecidos. Para as outras etiologias infecciosas encontradas aqui mais estudos animais ainda são necessários.

Tabela 6: Parâmetros dosimétricos

AUTOR	MODO OPERACIONAL CONTÍNUO OU PULSADO	CONCENTRAÇÃO DO FS	TIPO LUZ	TEMPO IRRADIAÇÃO (s)	SUBSTÂNCIA DILUÍDA	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	LARGURA DA BANDA ESPECTRAL (nm)	POTÊNCIA MÉDIA RADIANTE (W)
Zolfaghari	Não relatado	100 µg/ml	luz laser diodo	1800	Soro Fisiológico	665 nm	não relatado	200 mW
Volpe	Não relatado	0,50%	LED vermelho	1800 e 3600	Aquoso	663 nm	não relatado	não relatado
Tawfik	Não relatado	10 - 7 mg/ml	não coerente	898.8 para 80 J e 1123,2 para 100 J e para luz vermelha 1142,2 para 80 J e 1428 para 100 J.	Água destilada	vermelho (650 nm), a outra verde (530 nm).	não relatado	não relatado
Tanaka	Não relatado	100 µg	luz xenon	não relatado	Soro Fisiológico	660 nm	15 nm	não relatado
Machado de Sena	Não relatado	1 mM	laser vermelho	180 - 360	não relatado	660 nm	não relatado	100 mW
Nascimento	Não relatado	300 M	laser	40	não relatado	660 nm	não relatado	100 mW
Peloi	Não relatado	10 nM	LED	3600	não relatado	665 nm	não relatado	não relatado
Ragas	Não relatado	0.5 mM, 1 mM	luz vermelha	não relatado	Soro Fisiológico	635 ou 652 nm	15 nm	não relatado
Rineh	Não relatado	200 µM.	luz vermelha	1200	Soro Fisiológico	652 nm	15 nm	300 mW
Shih	Não relatado	31 mM	laser	780	Água estéril	650 nm	não relatado	não relatado
Tanaka	Não relatado	100 µM.	luz xenon	não relatado	Soro Fisiológico	660 nm	15 nm	não relatado

AUTOR	MODO OPERACIONAL contínuo ou pulsado	CONCENTRAÇÃO DO FS	TIPO LUZ	TEMPO IRRADIAÇÃO (s)	SUBSTITUIÇÃO DILUENTE	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	LARGURA DA BANDA ESPECTRAL (nm)	POTÊNCIA MÉDIA RADIANTE (W)
Cabral	Não relatado	100 μ M.	LED	1500	não relatado	660 +- 11 nm	não relatado	não relatado
Dai	Não relatado	NAM 400 μ M. AM e AT não relatados.	Luz vermelha	não relatado	não relatado	NAM: 635 +-15; AM: 660 +- 15;	não relatado	não relatado
de Santi	modo contínuo para laser e led.	100 μ M protoporfirina IX (PpNetNI) 10 μ M	LED e laser	720 para laser e LED	não relatado	Laser: 660,52 e	não relatado	Laser - 84 mW
El-Khordaghi	Não relatado	não relatado	LED	1500 para 100 J e 300 para 200 J.	Água destilada	660	não relatado	não relatado
Fila	Não relatado	RB - 50 μ M ; NAM - 10 μ M; porfirina TMPyP - 10 μ M e TLD1114 - 1 μ M.	LED	2220	solução planctônica	525+- 15	não relatado	não relatado
Fonseca	Não relatado	100 μ M.	LED	35,6	Soro Fisiológico	630	não relatado	60 mW
Huang	Não relatado	100 μ M.	laser	1920	não relatado	660	não relatado	1
Krespi	Não relatado	0.01% e 0.05 %	laser infravermelho	90 - 180	Soro Fisiológico	660	não relatado	não relatado
Li	Não relatado	Não relatado	Led	Não relatado	Não relatado	640+- 10	Não relatado	80 mW
Krasnoselsky	Não relatado	Não relatado	Led	Não relatado	Não relatado	630	Não relatado	Não relatado

Tabela 6: Parâmetros dosimétricos

AUTOR	ÁREA DE ABERTURA (cm ²) ou irradiância mV/cm ²	EXPOSIÇÃO RADIANTE (J/cm ²)	IRRADIÂNCIA NO ALVO (W/cm ²)	ENERGIA RADIANTE (J)	TÉCNICA APLICAÇÃO	NÚMERO DE SESSÕES	ÁREA DE ABERTURA (cm ²) ou irradiância mV/cm ²	EXPOSIÇÃO RADIANTE (J/cm ²)	IRRADIÂNCIA NO ALVO (W/cm ²)
Zolfaghari	1	360 J/cm ²	não relatado	não relatado	A luz foi entregue a uma distância constante da ferida para produzir uma iluminação de 1 cm ² de círculo	1	1	360 J/cm ²	não relatado
Volpe	03 cm com irradiação	não relatado	não relatado	não relatado	Dois sistemas de iluminação foram preparados, tendo uma placa de luz vermelha formada por seis fileiras de unidades de LED com 75 cm de comprimento total e 3 cm de largura, preso a uma base de madeira	Primeiro ciclo de 45 dias após infecção: todos os grupos 2 vezes/semana, por 4 semanas. Segundo ciclo, 105 dias após a infecção 3 vezes/semana por 4 semanas para grupos Gluc+PD	03 cm com irradiação	não relatado	não relatado

					nas laterais do tabuleiro, distante 4 cm (no primeiro sistema) e 1 cm (no segundo sistema) do LED. Entre os LEDs e as almofadas das patas dos animais, uma tela de metal foi colocada para segurar os animais.	T, PDT e Ampho+ PDT.			
Tawfik	LED verde 89 mW/cm ² , com tempo de irradiação de 14.98 min, para 80 J & 18.72 min.	não relatado	Não relatado	80 a 100	não relatado	Por 4 sessões, com 48 horas de intervalo.	LED verde 89 mW/cm ² , com tempo de irradiação de 14.98 min, para 80 J & 18.72 min.	não relatado	Não relatado
Tanaka	não relatado	seis diferentes fluências variando de 5 a 160 J/cm ² foram usadas	Não relatado	não relatado	não relatado	não relatado	não relatado	seis diferentes fluências variando de 5 a 160 J/cm ² foram usadas	Não relatado

		(5, 20, 50, 80, 120 e 160 J/cm ²).						(5, 20, 50, 80, 120 e 160 J/cm ²).	
Machado de Sena	ponta do laser 2 mm	não relatado	Não relatado	18 - 36 J	A ponta do laser (diâmetro de 2 mm) foi cuidadosamente colocada na entrada do canal vaginal.	Uma sessão (=660 nm, 100mW, 36 J, 6 min) ou duas sessões com um intervalo de 24 horas (=660 nm, 100mW, 18 J, 3 min).	ponta do laser 2 mm	não relatado	Não relatado
Nascimento	não relatado	133.3 J/cm ²	3.3 W/cm ²	4 J	Aplicada a 1 cm de ponto perpendiculares equidistantes e em contato com a lesão.	Três vezes na semana	não relatado	133.3 J/cm ²	3.3 W/cm ²
Peloi	não relatado	12 J/cm ²	5 mW/cm ²	não relatado	não relatado	Três vezes na semana por três meses	não relatado	12 J/cm ²	5 mW/cm ²
Ragas	não relatado	360 J/cm ²	Não relatado	não relatado	não relatado	não relatado	não relatado	360 J/cm ²	Não relatado
Rineh	300 mW	não relatado	12, 36, 84, 108 e 120 J/cm ²	Não relatado	não relatado	não relatado	não relatado	300 mW	não relatado
Shih	não relatado	não relatado	97.5 J/cm ²	Não relatado	não relatado	não relatado	não relatado	não relatado	não relatado

Tanaka	não relatado	não relatado	50 J/cm ²	Não relatado	não relatado	Irradiação imediata no joelho esquerdo com 1 cm de diâmetro usando um spot de luz xenon.	não relatado	não relatado	não relatado
Cabral	não relatado	não relatado	não relatado	Não relatado	150	não relatado	Uma sessão uma vez/dia e duas sessões 24 horas após o primeiro dia.	não relatado	não relatado
Dai	não relatado	não relatado	32,5 mW	não relatado	Contato (sobre o dorso da língua)	Uma sessão.	não relatado	não relatado	32,5 mW
de Santi	Laser - 0,01	não relatado	Não relatado	Laser - 60.48 e	Laser - entrada do canal vaginal e LED - trans-abdominal	Uma sessão de laser e LED.	Laser - 0,01	não relatado	not reported
El-Khordaghi	1,9	não relatado	Não relatado	700 J (100 J na	Sem contato (distância de 3,0 cm entre a luz e o tecido)	Uma sessão nos dias 0, 1, 3, 7 e 8.	1,9	não relatado	Não relatado
Fila	não relatado	150	50	não relatado	não relatado	Uma sessão	não relatado	150	50
Fonseca	não relatado	68.1	Não relatado	não relatado	não relatado	Uma sessão	não relatado	68.1	Não relatado
Huang	0,98 mm	não relatado	50	50 e 100 J	Dentro da bexiga	Uma sessão	0,98 mm	não relatado	50

Krespi	não relatado	não relatado	Não relatado	não relatado	não relatado	Uma sessão	não relatado	não relatado	Não relatado
Li	Não relatado	40	Não relatado	Não relatado	Não relatado	1X / semana por 3 semanas	Não relatado	40	Não relatado
Krasnoselskiy	Não relatado	45	Não relatado	Não relatado	Não relatado	Uma sessão	Não relatado	45	Não relatado

7. LIMITAÇÕES

As limitações desta revisão incluem a heterogeneidade significativa na qualidade dos estudos, nas infecções estudadas bem como nos protocolos de irradiação e grupos controle analisados. Esta revisão também pode ser afetada pelo viés de relatar apenas estudos publicados, portanto com resultados positivos, sendo que os negativos e resultados ambíguos de aPDT podem não ter sido publicados. O resultado clínico, os métodos de avaliação, os parâmetros da aPDT e o os tempos de acompanhamento foram altamente variáveis entre os estudos. Em relação a uma possível aplicação clínica da aPDT, é urgente mesmo nos estudos animais, publicações com um maior nível de evidência e protocolos mais uniformes que comparem aPDT diretamente com técnicas padrão, com amostras maiores e métodos mais objetivos de avaliação clínica, a fim de fornecer dados úteis para os protocolos de aPDT clinicamente relevantes. Além disso, a gravidade e a profundidade da infecção podem desempenhar um papel fundamental na resposta ao tratamento.

8. CONCLUSÃO

Os dados mais promissores encontrados nesta revisão se referem a onicomicose, candidíase oral e vaginal e nas infecções de pele bacterianas e por *Leishmania Tegumentar*. Não foram relatados efeitos adversos animais da aPDT nos estudos incluídos na revisão atual, sugerindo que aPDT é uma técnica segura quando aplicada de forma controlada, sob supervisão, e nas infecções superficiais. Em relação aos parâmetros dosimétricos da luz, lasers, LEDs e lâmpadas foram utilizados, sempre englobando o comprimento de onda vermelho, sendo compatível com o AM; as irradiâncias variaram de 3.3 a 50 W/cm²; as exposições radiantes variaram 6 a 360 J / cm², e os tempos de irradiação variaram de 85,6 segundos a 60 minutos. A enorme variabilidade dos protocolos utilizados não nos permitiu realizar uma análise quantitativa / metanálise.

A aPDT com AM permite o uso de uma ampla gama de valores para cada parâmetro, mas deve haver um consenso de que um valor mínimo é necessário para observarmos os efeitos positivos. Assim, os riscos de desconforto térmico nos tecidos-alvos ou fototoxicidade podem ser evitados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACELLAR, I.O.L.; et al. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci.* v. 16, p. 20523-559, 2015.

BALTAZAR, et al., Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 202 ISSN 1664- 302X. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25821448>.

BARREIROS, A.L.B.S., et al. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and organism's defense. *Quim. Nova.* v. 09, n. 1, p. 113-23, 2006.

BHATTA, et al., Photodynamic therapy for onychomycosis: a systematic review, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15 (2016) 228–235 ISSN 1873- 1597. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27477248>.

BENOV, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Med Princ Pract.* v. 24, suppl. 1, p. 14-28, 2015.

BOLTES CECATTO, R et al. Methylene blue mediated antimicrobial photodynamic therapy in clinical human studies: The state of the art. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* Sep, v. 31 (2020) 101828.

BROWN, S. Clinical antimicrobial photodynamic therapy: phase II studies in chronic R. Boltes Cecatto, et al. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 31 (2020) 101828 9 wounds, *J. Compr. Canc. Netw.* 10 (Suppl 2) (2012) S80–3 ISSN 1540-1413. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055223>.

CABRAL, FV et al. Preclinical investigation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy of *Leishmania* parasites using real-time bioluminescence. *Photochem Photobiol.* May, v.96 (3), p. 604-610, 2020.

CAMACHO-ALONSO, F et al. Use of photodynamic therapy and chitosan for inactivation of

Candida albicans in a murine model. *J Oral Pathol Med.* V. 45, p. 627-633, 2016.

CARRINHO et al. A study on the macroscopic morphometry of the lesion area on diabetic ulcers in humans treated with photodynamic therapy using two methods of measurement, *Photomed Laser Surg.* 36 (1) (2018) 44–50 ISSN 1557-8550. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29023192>.

CHEN, Y et al. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Japanese Cancer Association.* v. 99, n. 10, p. 2019-2027, 2008.

DAI, T et al. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatments of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrobs Agents Chemother.* Dec, v. 55 (12), p. 5710-7, 2011.

DeROSA, MC, CRUTCHLEY, RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews.* p. 233-234: 351-371, 2002.

EL-KHORDAGHI, L et al. Photosensitizer-eluting nanofibers for enhanced photodynamic therapy of wounds: A preclinical study in immunocompromized rats. *Int J Pharm.* V. 520, p. 139-148, 2017.S

FIGUEIREDO E SOUZA et. al., L.W. Randomized controlled trial comparing photodynamic therapy based on methylene blue dye and fluconazole for toenail onychomycosis. *Dermatol. Ther.* 27 (1) (2014) 43–47 ISSN 1529-8019. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24502311>.

FILA, G et al. Murine model imitating chronic wound infections for evaluating antimicrobial photodynamic therapy efficacy. *Front Microbiol.* Aug 9, v. 7, art. 1258, 2016.

FREIRE, F et al. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. *J Photochem Photobiol B.* Jun 159, p. 161-8, 2016.

FONSECA, THS et al. Transmission electron microscopy revealing the mechanism of action of photodynamic therapy on *Trichomonas vaginalis*. *Acta Trop.* Feb, v.190, p. 112-118, 2019.

HAMBLIN, MR; HASAN, T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* v. 3, n. 5, p. 436-50, 2004.

HOOIJMANS, C et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Medical Research Methodology.* v. 14, n. 43, 2014.

HUANG, Y et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue and potassium iodide to treat urinary tract infection in a female rat model. *Sci Rep.* May, 8; 8 (1), p. 7257, 2018.

JORI, G et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* v. 38, n. 5, p. 468-81, 2006.

KHADEMI, H et al. Comparative evaluation of photodynamic therapy induced by two different photosensitizers in rat experimental candidiasis. *Den Res J (Isfahan).* Jul: 11 (4), p.452-9, 2014.

KARU, TI. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* v. 20, n. 2, 2014.

KRASNOSELSKIY, LL et al. Photodynamic therapy effect on healing of radiation skin ulcer infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Problems of radiation medicine and radiobiology.* v. 22, p. 202-207, 2017.

KRESPI, YP et al. Laser-induced microbial reduction in acute bacterial rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 23, p. e29-e32, 2009.

LANZAFAME, RJ. Photobiomodulation, tissue effects and bystanders. *Photomed Laser Surg.* v. 29, n. 8, p. 519-20, 2011.

LANDIS, SC et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. *Nature*. Oct v. 11, n. 490 (7419), p. 187-191, 2012.

LI, J et al. Fungicidal efficacy of photodynamic therapy using methylene blue against *Sporothrix globosa* *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Dermatol*. 29 (2), p. 160-66, 2019.

MACHADO-DE-SENA, RM et al. Photodynamic therapy has antifungal effect and reduces inflammatory signals in *Candida albicans*- induced murine vaginitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Sep, v. 11 (3), p. 275-82, 2014.

MARTINS, JS et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Jan, v. 111 (1), p. 71-77, 2011.

MOHER, D et al. All in the family: systematic reviews, rapid reviews, scoping reviews, realist reviews, and more. *Systematic Reviews*. v. 4, p. 183, 2015.

NASCIMENTO, CL et al. Comparative study between photodynamic and antibiotic therapies for treatments of footpad dermatites (blubfoot) in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Mar, v.12 (1), p. 36-44, 2015.

PATEL, M; RAMAVATARAM, DVSS. Non transferrin bound iron: nature, manifestation and analytical approaches for estimation. *Ind J in Biochem*. v. 27, n. 4, p. 322-332, 2018.

PELOI, LS et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses*. *Exp Parasitol*. Aug, v. 128 (4), p. 353-356, 2011.

RAGAS, X et al. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *in vitro* and *in vitro* studies. *Lasers Surg Med*. Jul, v. 42 (5), p. 384-90, 2010.

REDMOND, RW; KOCHEVAR, I.E., Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*. v. 82, n. 5, p. 1178-1186, 2006.

RINEH, A et al. Attaching the NorA efflux pump inhibitor INF55 to methylene blue enhances antimicrobial photodynamic inactivation of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* e *in vivo*. *ACS Infect Dis*. Oct 13, v. 3 (10), p. 756-766, 2017.

SANTI, MESO et al. Antimicrobial photodynamic therapy as a new approach for the treatments of vulvovaginal candidiasis: preliminar results. *Lasers Med Sci*. Dec, v. 33 (9), p. 1925-1931, 2018.

SENA, ES et al. Systematic reviews and meta-analysis of preclinical studies: why perform them and how to appraise them critically. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. v. 34, p. 737-42, 2014.

SERTE, NP et. al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 2020 Jul 14;18(7):e3000411.

SEVERINO, D et al. Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. *Photochemistry and Photobiology*. v. 77, n. 5, p. 459-68, 2016.

SHIH, M-H and HUANG, F-C. Effects of photodynamic therapy on rapidly growing nontuberculous mycobacteria keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jan 5, v. 52 (1), p. 223-9, 2011.

SHULTZ et. al. Radiculomyelopathy following intrathecal instillation of methylene blue. A hazard reaffirmed, *Arch. Neurol.* 22 (3) (1970) 240–244 ISSN 0003-9942. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5466964>.

SUN, Y et al. Antimicrobial photodynamic therapy in skin wound healing: A systematic review of animal studies. *Int Wound J*. v. 17, p. 285-99, 2020.

TANAKA, M et al. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis via neutrophil accumulation. *PLoS One*. Jun, v. 7 (6), p. e39823, 2012.

TANAKA, M et al. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis. *Photochem Photobiol.* May, v. 89 (3), p. 679-682, 2013.

TARDIVO, JP et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodynamic Ther.* v. 2, p. 175-91, 2005.

TARDIVO, JP et al. Small scale trial of photodynamic treatment of onychomycosis in São Paulo, J. Photochem. Photobiol. B 150 (2015) 66–68 ISSN 1873-2682. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25835504>.

TAWFIK, AA et al. A study of the treatments of cutaneous fungal infection in animal model using photoactivated composite of methylene blue and gold nanoparticle. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* Sep, v. 15, p. 59-69, 2016.

TEICHERT, MC et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in a immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Feb, v. 93 (2), p. 155-60, 2002.

TOMANEK, L. Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *J Exp Biol.* v. 218, Pt 12, p. 1867-79, 2015.

VOLPE, RAFN et al. Photodynamic therapy for the treatments of American tegumentar Leishmaniasis: evaluation of therapies association in experimentally infected mice with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Lasers Med Sci.* Fall, v. 9 (4), p. 274-82, 2018.

VRIES, RBM et al. A protocol format for preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. *Evidence-based Preclinical Medicine.* v. 1, n. 1, p. 1-9, 2015.

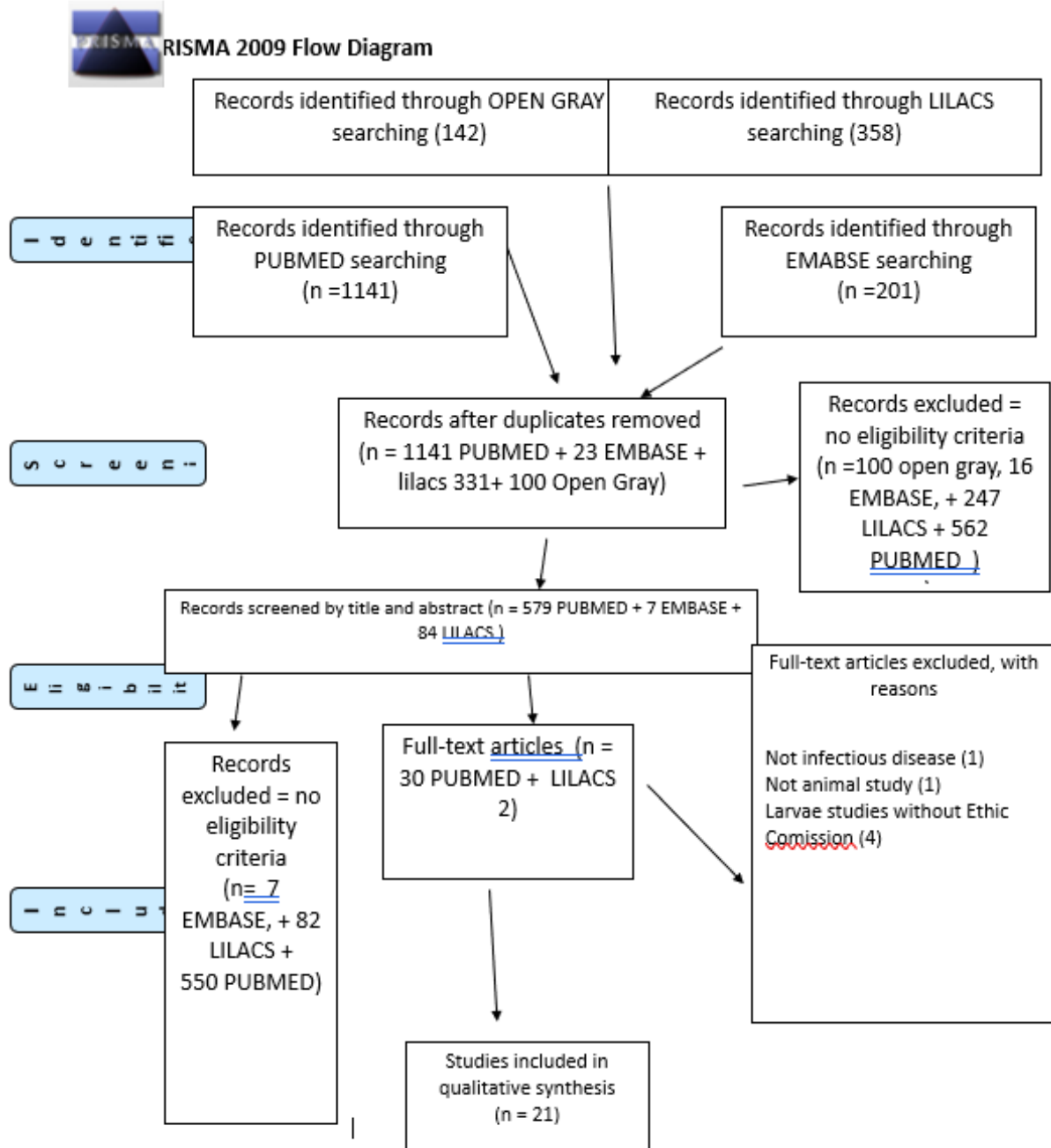
WAINWRIGHT, M; CROSSLEY, K.B. Methylene Blue - a therapeutic dye for all seasons? *Journal of Chemotherapy.* v. 14, n. 5, p. 431-43, 2002.

WAINWRIGHT, M., et al. Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains. *J Photochem Photobiol B*, v. 150, p. 38-43, 2015.

WAINWRIGHT, M; McLEAN, A. Rational design of phenothiazinium derivatives and photoantimicrobial drug discovery. *Dyes Pigm.* v. 136, p. 590-600, 2017.

ZOLFAGHARI, PS et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agente. *BMC Microbiol.* Feb, v. 4 (9), p. 27, 2009.

Figura 5: Fluxograma Prisma



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *BMC Med* 8(6): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed.1000097